

蛍光寿命マッピングシステム SPEX FluoroMap

Stephen M. Cohen, James Mattheis

要旨

蛍光マッピングは顕微鏡下で蛍光部位を特定する計測手法で、生物学や材料科学等の多くの分野における研究を前進させるのに非常に有効な方法である。ジョバンイボン社の蛍光寿命マッピングシステム SPEX FluoroMapは、共焦点顕微鏡を搭載した定常蛍光スペクトル及び蛍光寿命測定装置で、先進的な研究室において、高信頼性・高感度の蛍光マッピングを可能にしている。本稿では、蛍光マッピング機能について、染料、写真増感剤、植物の葉緑素の実測例を示して紹介する。

1 はじめに

蛍光マッピング、すなわち顕微鏡下で試料表面をX-Y平面走査する蛍光測定は、最近、生物学やナノ材料の研究分野において特に注目されている^[1]。

本法は、*in vitro*あるいは*in vivo*を問わず、細胞内物質や生体反応の研究に最適である。蛍光マッピングには、定常スペクトルの測定走査、スペクトルの画像化^[2]、共焦点蛍光顕微鏡測定^[3]、各種蛍光分子の寿命を識別しながらの測定走査^[4]、高速・高解像度の三次元顕微鏡による測定^[5]、二光子走査顕微鏡による測定^[6]などが可能である。

蛍光マッピングを使った研究例としては次のようなものが挙げられる。脂質二重層膜^[7]、細胞分化^[8]、乳がん^[9]、単分子pHセンサ^[10]、繊維芽細胞内の感光物質^[11]、細胞組織の固定化^[12]、好酸性光合成細菌*Rhodospseudomonas acidophila*^[13]や緑色植物^[14]による光捕集複合体、緑色蛍光たんぱく質^[15]等である。

ジョバンイボン社(JY)は、新しい蛍光寿命マイクロマッピングシステムSPEX FluoroMap(図1)を開発した。本システムは、定常スペクトル及び寿命測定の両方で共焦点蛍光マッピングを、容易かつ高い信頼性で行うことができる。

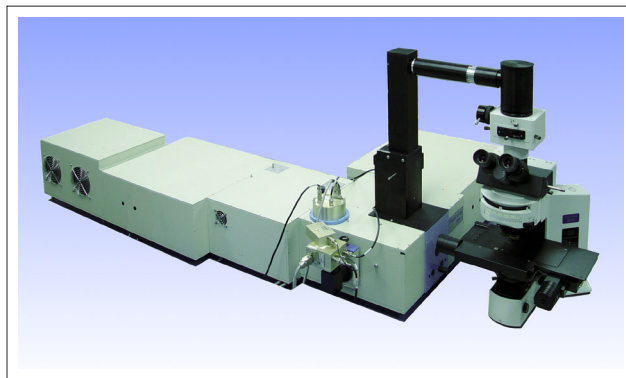


図1 蛍光寿命マッピングシステム SPEX FluoroMap

2 測定方法

2.1 システム構成

蛍光マッピングは原理的に大変シンプルな測定方法で、X-Y方向に再現性良く移動できる顕微鏡のステージに試料を置いて、特定波長の励起光で照射するだけである。全体の蛍光像を記録した後、測定者は試料上のどの点でフルスペクトル測定または寿命測定を行うかを選ぶ。プログラマブルステージは指定した領域に移動し、蛍光分光計がこの領域を走査して、蛍光を測定する。図2にFluoroMapの光学系の概念図を示す。

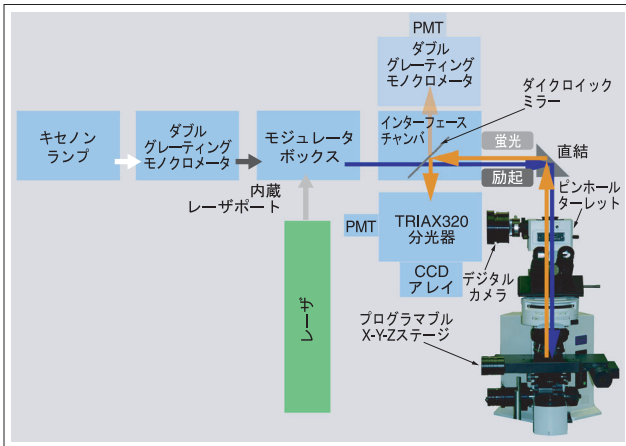


図2 FluoroMapの光学系概念図

2.2 定常蛍光スペクトルマッピング

定常蛍光スペクトルマッピングを行う場合は、ポッケルスセル・モジュレータを光路から外す。連続キセノンランプから出る紫外から近赤外までの広い波長範囲の強い光が、ダブル・グレーティング・モノクロメータ(内蔵レーザーポートも付属)に導かれる。モノクロメータから出た単色光は、ダイクロイックミラー(特定の波長を透過し、他の波長は反射する光学素子)が入った蛍光分光計と顕微鏡のインターフェイス・チャンバを通過して、共焦点顕微鏡のマルチピンホール・ターレットに入射される。ピンホールの大きさは測定者が自由に選択することができる。入射した励起光は、X-Y-Zに駆動する顕微鏡プログラマブルステージ上の試料を照射する。

試料からの蛍光を直接観察するために、双眼の接眼レンズ及びデジタルカメラが利用できる。測定者は試料像をデジタルカメラで撮影し、得られたデジタル画像の中から測定すべき領域を選ぶ。ホストコンピュータからプログラマブルステージを動かし、試料を指定された場所に移動させる。

生じた蛍光は顕微鏡に戻り、インターフェイス・チャンバのダイクロイックミラーで反射され、TRIAX 320分光計に導かれる。蛍光は分光されてCCDアレイまたは光電子増倍管(PMT)で検出される。得られた各領域の蛍光スペクトルはソフトウェアで解析される。

2.3 蛍光寿命マッピング

蛍光寿命をマッピングするにはポッケルスセル・モジュレータを光路に入れる。これはノブを廻すだけの操作で済む。キセノンランプの光はモノクロメータで分光され、単色光がモジュレータボックスに導かれる。ポッケルスセル・モジュレータで変調され、インターフェイス・チャンバ、顕微鏡、ピンホールターレットを通して試料を励起する。

定常蛍光スペクトル測定と同様に、蛍光試料の画像をデジタルカメラで撮影し、蛍光寿命の測定領域を選ぶ。ホストコンピュータはステージを指定の場所に移動させ、試料からの復調された蛍光反応を捉える。復調された蛍光は、インターフェイス・チャンバに戻り、ダイクロイックミラーで反射されてダブル・グレーティング分光器に入り、最後に、CCDアレイまたはPMTにより検出される。蛍光寿命は非線形最小二乗法で計算される。

FluoroMap で使用するソフトウェアの例を図3に示す。この図には、ステージ位置決め、対物レンズの倍率、ピンホールサイズ、保存用ファイル名などの顕微鏡パラメータの選択方法が示されている。

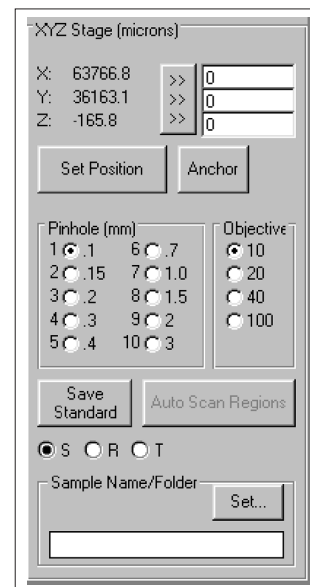


図3 顕微鏡パラメータ設定画面

上: プログラマブルステージの位置

中: 顕微鏡のピンホールと対物レンズの選択

下: 試料の種類(S: 信号, R: 基準, T: 第3検出器)とファイル保存パラメータ

3 実証実験の例とその結果

生物学及び材料科学分野におけるFluoroMapが持つ分析能力を実証するためにいくつかの実験を行った。

3.1 蛍光性微粒子の分別

最初に、染料粉末の混合物中の蛍光性微粒子を分別する実験を行った。フルオレセイン(オレンジ色の粉, athesion製), ローダミン-6G(暗赤色の粉, Eastman製), ナイルブルーA(緑がかった青色の粉, Aldrich製)の微結晶をほぼ同量で混合し, スライドガラスに貼り付けた両面テープ上に塗布した。20倍の対物レンズと0.4 mmの共焦点ピンホールを使ってFluoroMapで得た混合物の顕微鏡像を図4に示す。なお, この領域はFluoroMapのマイクロマッピング機能を使って調査された。

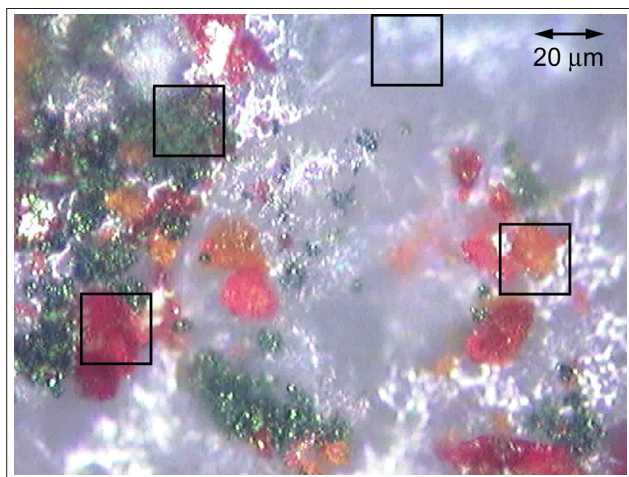


図4 染料粉末混合物の顕微鏡像

フルオレセイン(橙), ローダミン-6G(赤), ナイルブルーA(濃緑)の混合物。対物20倍。灰色と白の領域は両面テープを示す。各四角表示部は図6で示す蛍光分光測定した領域。

定常マイクロマッピングを使って実測した領域を図5に示す。

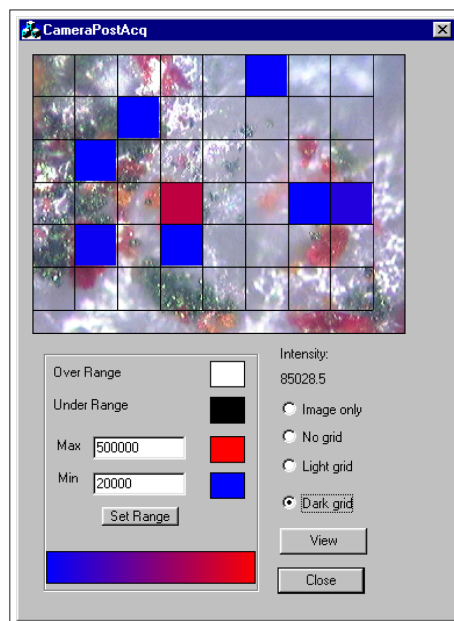


図5 蛍光測定した領域を示す画面

赤色は蛍光強度が高い部位, 青色は低い部位。

励起光源は450 Wのキセノンランプを使った。ダブルグレーティングの励起モノクロメータは波長を420 nmとし, 入射スリット幅7 mm, 中間スリット幅3 mm, 出射スリット幅1 mmとそれぞれ設定した。発光側分光器(TRIAX 320)は, 470 nmから750 nmまで2 nmステップで走査させた。入射及び励起スリット幅は1.5 mmとした。検出器には950 Vを印加した光電子増倍管を使用した。ステップあたりの積分時間は2秒, 観察領域は粉末の相対的な存在量に基づいて選択し, この他に, パウダーが全く存在しない領域も1箇所選択した。青色及び赤色に着色させた領域が, 蛍光スペクトル測定した領域である。赤色は, 蛍光強度が最強に近い領域を, 青色は蛍光強度が低い領域を示している。更に, 顕微鏡のシャッターを閉じた状態でバックグラウンドを測定した。なお, ここで示す測定結果はすべて, バックグラウンド減算している。

図6に次の4箇所蛍光スペクトルを示す。

- 主にローダミン-6Gが存在する部分
- ナイルブルーAの部分
- フルオレセインが優勢な部分
- 基材テープの部分

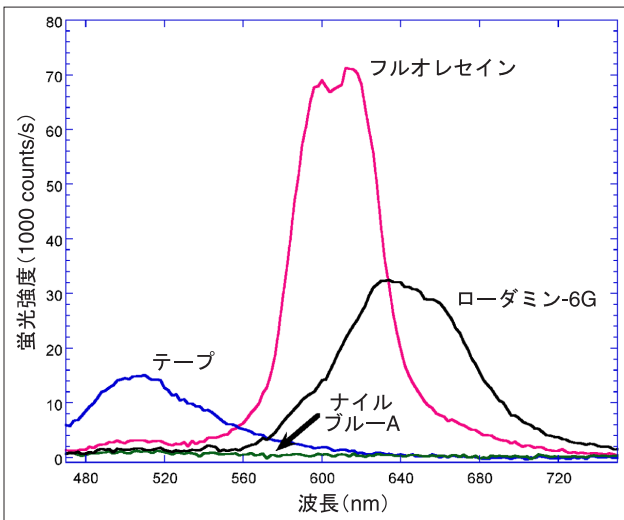


図6 4箇所の蛍光分光スペクトル
バックグラウンド減算済。励起波長420 nm。

図4と図5を比較すると、最も高い蛍光強度を示した赤色部はフルオレセインの結晶とローダミン-6Gの結晶によって構成されていることがわかる。混合物であるため、本稿で示した解像度では分離させることができないので、ここでは掲載していない。

図6に4個所の蛍光スペクトルを示す。最も強いスペクトル(赤色)はフルオレセインからのもので、600 nm及び620 nm付近の2重ピークと、510 nm付近に基材テープからの弱い信号が現れている。2番目に強いのはローダミン-6Gのスペクトル(黒色)で、632 nm付近にピーク、656 nm付近に広い幅の発光が見られる。粉末を保持している両面テープ(青色)は510 nm付近で蛍光を発している。ナイルブルー-A(緑色)は、510 nmのテープからの非常に弱い信号を別にして、目立ったピークは認められない。

これらの蛍光強度差の原因はいろいろ考えられるが、量子効率及び物質ごとに異なる最適励起波長の違いであろうと考えている。

3.2 微小単結晶の部位による違いの測定

2つ目の定常蛍光実験は、微小単結晶研究で、蛍光染料と写真増感剤1,1-ジエチル-2,2-シアニンヨウ化物、つまりPIC (Aldrich製) 結晶についてのものである。図7に100倍の倍率で観察したPIC単結晶の顕微鏡像と蛍光スペクトルを測定した4つの領域を示す。測定条件として、励起モノクロメータは、波長420 nm、入射スリット幅7 mm、中間スリット幅1 mm、出射スリット幅3 mmに設定し、発光は、550 nmから700 nmまでを2 nmのステップで走査した(入射及び出射スリット幅2 mm、積分時間1秒)。なお、ピンホールサイズは0.1 mmで、100倍の対物

レンズを使用した。図8はバックグラウンド減算した結果で、同一のPIC結晶内でも部位によって蛍光スペクトルが異なっていることがわかる^[16]。スペクトル3と4は定性的に類似であるが、スペクトル1と2は異っている。

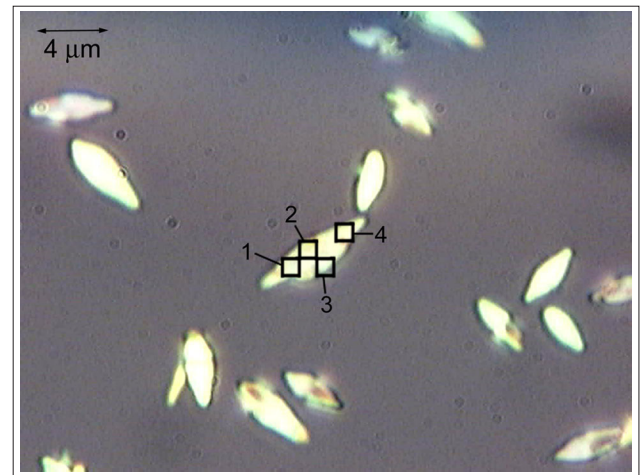


図7 PIC微小単結晶の顕微鏡像(対物レンズ: 100倍)
四角表示部は、図8で示す蛍光分光測定した部位。

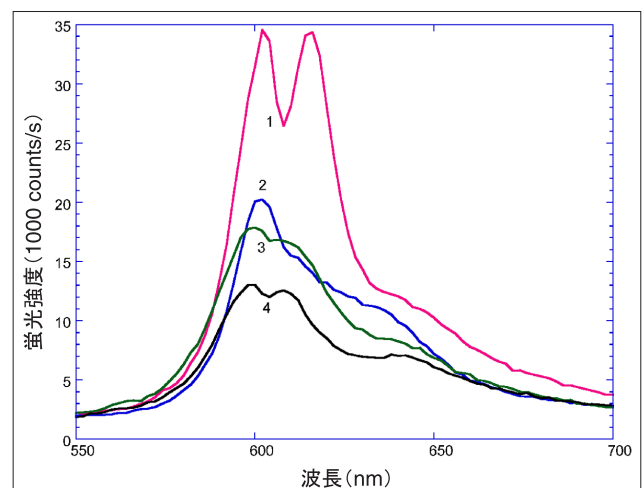


図8 PIC結晶上の4個所の蛍光スペクトル
バックグラウンド減算済。励起波長420 nm。

3.3 植物細胞の測定

最後に、オリヅルラン(ユリ科の室内用鉢植え植物)の生きている細胞をFluoroMapで測定した。クロロフィル(葉緑素)が短波長光照射で赤い蛍光を発した^[17]。

明視野下での葉っぱ部の顕微鏡像(40倍の対物レンズを使用)を図9(a)に示す。緑色の部分が葉緑体で、曲がった暗いひも状のものは細胞壁である。クロロフィルは、光合成器官を含む外膜であるチラコイド(葉緑体の中にある2重の膜で覆われた細胞)の中に存在する。

葉緑体からの赤い蛍光を図9(b)に示す。波長を一定(680 nm)にして、図9(b)に示す格子状を測定走査した。試料は0.1 mm共焦点ピンホールを通った空冷アルゴンレーザ光(波長457 nm)で励起した。励起用モノクロメータの各スリット幅を2 mm, 積分時間0.1秒に設定した。測定部位は縦横2 μm × 2 μmに相当する。位置と蛍光強度(高さ方向)の三次元像を図10に示すが、蛍光ピークが葉緑体の位置とよく一致していることがわかる。

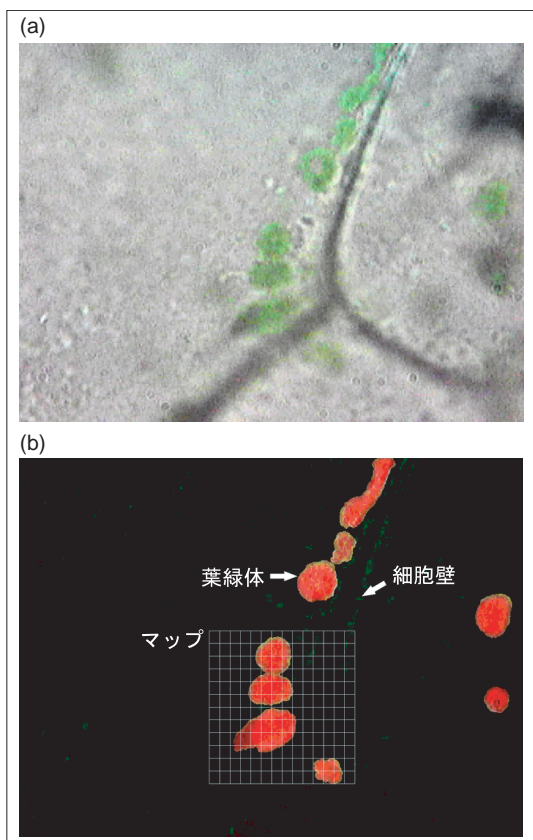


図9 植物細胞の顕微鏡像(対物レンズ:40倍)

(a) 緑色の葉緑体部と暗い細胞壁

(b) 葉緑体が蛍光を発した状態の(a)と同じ箇所

格子部はFluoroMapでマッピングした領域を示す。格子内の各四角の縦横は2 μm × 2 μm

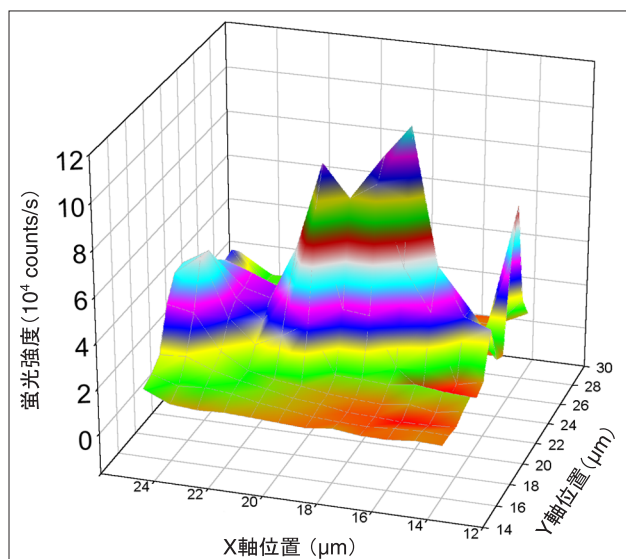


図10 蛍光強度(測定波長:680 nm)の二次元分布

ピンホール0.1 mm, 励起波長457 nm, 積分時間0.1秒, バンドパス2 nm (蛍光側モノクロメータ)。

4 おわりに

FluoroMap は、JYが開発した優れた蛍光分光マッピング装置である。本装置を使うと微細領域の蛍光特性を容易かつ高い精度で分析することができる。また、定常蛍光スペクトル測定と蛍光寿命測定が、微細な生物試料に対して高速かつ効率よくできる。FluoroMap は、研究用の蛍光寿命分光装置SPEX Fluorolog-Tau3をベースに設計されたもので、生物学及び生物化学分野における蛍光研究、更には、急速に変わりつつあるナノ材料分野の研究に大きな変革をもたらすものと期待している。

参考文献

- [1] Ahern, H., Fluorescence Microscopy Systems Probe New Ground in Cell Studies. *The Scientist*, 9 (8) : 17 (1995); http://www-ee.eng.buffalo.edu/faculty/cartwright/teaching/ee494s2000/Presentations/Confocal_Microscopy_of_Electronic_Devices.pdf.
- [2] Levenson, R., Spectral Imaging: Fluorescence and Brightfield, in *Microscopy and Microanalysis 2001*, vol. 7, Suppl. 2, Proc., Springer, 2001, pp. 20-21.
- [3] Wilson, T., *Confocal Microscopy*, London, Academic Press, 1990.
- [4] Lakowicz, J.R., *Biomedical Applications of Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy*, pp. 13-14, and Birch, D.S.J. and Hungerford, G., *Instrumentation for Red/Near-infrared Fluorescence*, pp. 384-385, in Lakowicz, J.R., ed., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, vol. 4. New York, Plenum Press, 1994; French, T., *Lifetime Imaging and an Application in Immunology*. Ph.D. Thesis, Univ. of Illinois at Champagne-Urbana, 1996.
- [5] Hell, S.W., et al., 3D-Microscopy: Pushing Speed and Resolution to the Limits, 4th International Weber Symposium on Innovative Fluorescence Methodologies in Biochemistry and Medicine, Kaanapali, HI, June 23-27, 1999.
- [6] Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002, pp. 355-356.
- [7] Korklach, J., et al., Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 8461-8466 (1999).
- [8] Kohen, E., et al., Multiprobe fluorescence imaging and microspectrofluorometry of cell transformation and differentiation: implications in terms of applied biochemistry and biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 191-205 (1999).
- [9] Gramain, M.P., et al., Fluorescence microscopy image deconvolution: application to anthracycline distribution in breast cancer cells. *Proc SPIE Vol. 3197*, pp. 187-193, *Optical Biopsies and Microscopic Techniques II*, Bigio, I.J., et al., eds., 1997.
- [10] Brasselet, S. and Moerner, M.E., Fluorescence Behavior of Single-Molecule pH-Sensors. *Single Mol.* 1: 17-23 (2000).
- [11] Pattison, D.I., et al., A Study of the Subcellular Localisation of Photosensitisers in V79/4 Fibroblasts and Model Systems by Time-Resolved Fluorescence Microscopy. CLF Annual Report, 1997/98, Central Laser Facility, Chilton, UK, pp. 129-131.
- [12] Xu, M.G., et al., Effect of handling and fixation processes on fluorescence spectroscopy of mouse skeletal muscles under two-photon excitation. *Appl. Opt.* 39 (34) : 6312-6317 (2000).
- [13] Bopp, M.A., et al., Fluorescence and photobleaching dynamics of single light-harvesting complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10630-10635 (1997).
- [14] Barzda, V., et al., Fluorescence Lifetime Heterogeneity in Aggregates of LHCII Revealed by Time-Resolved Microscopy. *Biophys. J.* 81: 538-546 (2001).
- [15] Ishii, Y. and Yanagida, T., Single Molecule Detection in Life Science. *Single Mol.* 1: 5-16 (2000).
- [16] Vanden Bout, D.A., et al., Spatially Resolved Spectral Inhomogeneities in Small Molecular Crystals Studied by Near-Field Scanning Optical Microscopy. *J. Phys. Chem.* 100: 11843-11849 (1996).
- [17] Govindjee and Yang, L. *J. Gen. Physiol.* 49: 763-780 (1966).



Stephen M. Cohen, PhD

Jobin Yvon Inc.
Fluorescence Division
Technical Writer



James Mattheis, PhD

Jobin Yvon Inc.
Applications Manager